

REC'D 25 MAR 2003

WIPO PCT

PO/KR 03/00455

RO/KR 08.03.2003

Rec'd PCT/PTO 07 SEP 2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출 원 번 호 : 10-2002-0012409

Application Number

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

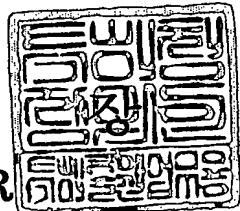
출 원 년 월 일 : 2002년 03월 08일
Date of Application

출 원 인 : (주)뉴로제넥스
Applicant(s) NEUROGENEX CO., LTD.

2003 년 03 월 08 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.03.08
【발명의 명칭】	형광강도가 증강된 삽입형 녹색 형광 단백질 및 그 유전자
【발명의 영문명칭】	Enhanced Inserted YFP
【출원인】	
【명칭】	(주)뉴로제넥스
【출원인코드】	1-2001-043953-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	신동승
【성명의 영문표기】	SEEN, Dongseung
【주민등록번호】	680930-1168211
【우편번호】	151-782
【주소】	서울특별시 관악구 봉천본동 두산아파트 108-2104
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김경진
【성명의 영문표기】	KIM, Kyungjin
【주민등록번호】	520101-1024511
【우편번호】	120-757
【주소】	서울특별시 서대문구 대현동 럭키아파트 104-1102
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	손호선
【성명의 영문표기】	SON, Hosun
【주민등록번호】	700509-1775012
【우편번호】	151-782
【주소】	서울특별시 관악구 봉천본동 두산아파트 107-1205
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 정연철
 【성명의 영문표기】 CHUNG,Neon C.
 【주민등록번호】 701225-1674616
 【우편번호】 151-774
 【주소】 서울특별시 관악구 봉천5동 삼성아파트 133-1801
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 강 안토니
 【성명의 영문표기】 KANG,Anthony D.
 【주소】 서울 관악구 봉천5동 관악드림타운 110-1602
 【국적】 US

【발명자】

【성명의 국문표기】 박재용
 【성명의 영문표기】 PARK,Jae Yong
 【주민등록번호】 680415-1056218
 【우편번호】 150-043
 【주소】 서울특별시 영등포구 당산동3가 평화아파트 C-201
 【국적】 KR

【심사청구】

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 2
 【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.
 원인 (주)뉴로제넥
 스 (인)

【수수료】

【기본출원료】	16	면	29,000	원
【가산출원료】	0	면	0	원
【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	7	항	333,000	원
【합계】			362,000	원
【감면사유】			종소기업	
【감면후 수수료】			181,000	원

20020012409

출력 일자: 2003/3/14

【첨부서류】

1. 중소기업기본법시행령 제2조에의한 중소기업에 해당함을
증명하는 서류_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 변종 녹색 형광 단백질 유전자 및 그 발현산물인 형광단백질 (inserted YFP)에 관한 것으로서, 외래의 단백질이나 단백질 부위(domain)를 코딩하고 있는 염기서열을 삽입하여도 그 발현 산물이 37°C에서 형광을 유지하고 기존의 동종 단백질에 비해 20배에 달하는 형광 강도를 보임을 그 특징으로 하고 있다.

본 발명에서는 특정한 아미노산 서열을 형광 단백질 내에 삽입할 수 있도록하기 위하여, 디엔에이(DNA) 염기서열상에서 특별히 목적한 돌연변이를 도입할 수 있도록 고안된 프라이머를 제조하였고, 이를 이용해서 돌연변이 유발형 피씨알 (error prone PCR)을 수행하고 이를 포유동물 세포주에서 유전자 운반체로 사용되는 pcDNA3에 클로닝하였다. 제조된 변종 녹색 형광 단백질 유전자를 세포내에 도입하고 그 형광의 강도가 강하게 유지되는 변종 형광단백질을 선별함으로써 여러 염기서열의 삽입이 가능하고, 그 발현산물이 강한 형광을 잃지 않는 변종유전자 및 그 변종 녹색 형광 단백질을 발명하게 되었다.

【대표도】

도 1a

【색인어】

녹색 형광 단백질(GFP), 황색 편이 녹색 형광 단백질(YFP), 삽입(insertion), 삽입형광단백질(inserted YFP), 단백질 분해 효소(protease), 단백질 분해 효소 기질(protease substrate), 절단 부위(cleavage domain), 단백질 결합 부위(binding domain), C형 간염바이러스(HCV), NS3단백질 분해 효소(NS3 protease)

【명세서】

【발명의 명칭】

형광강도가 증강된 삽입형 녹색 형광 단백질 및 그 유전자{Enhanced Inserted YFP}

【도면의 간단한 설명】

도1a는 헬라(HeLa) 세포에 제조된 삽입형광단백질을 도입한 후 공초점 현미경으로 촬영한 A)Citrine-Ins, B)Y-Citrine, C) Peridot, D)Y-Citrine-5AB, E) Peridot-5AB의 형광사진

도1b는 도1a의 이미지를 정량화하여 제조된 삽입형광단백질들의 형광 강도를 비교한 그림

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <4> 본 발명은 외부의 염기서열을 삽입함으로써 삽입된 염기서열의 세포내에서의 역할을 규명할 수 있도록 사용할 수 있는 형광 단백질에 관한 것이다.
- <5> 녹색 형광 단백질(GFP)은 유전자의 발현과 그 발현 산물인 단백질의 양적, 위치적 특성을 보고하는 리포터로서 광범위하게 사용되고 있으며 활용분야가 급격히 증가되고 있다. 다양한 목적에 적용되어 오면서 그 특성에 맞도록 고안된 새로운 변종 녹색 형광 단백질들이 만들어져 오고 있었다.

<6> 1998년 옥스포드그룹에서 녹색형광단백질(GFP)내의 여러 위치에 외부 단백질이나 펩타이드를 삽입하여도 그 형광을 유지한다는 보고(NAR 26:623-630)가 있은 후에, 첸(R.Tsien) 그룹 등에서 보고한 삽입형광단백질 계열의 분자들이 사용되고 있다. 특히 첸그룹에서 보고하고 있는 삽입형광단백질의 경우 와이에프피인스(YFPins)와 여기에 칼모듈린이 삽입된 캄가루(Camgaroo) 등이 있다. 기존의 삽입가능한 녹색 형광 단백질의 경우 1999년에 첸 등이 발표한 논문에 따르면 145번 아미노산인 티로신(Tyrosine)이 GGTGEL이라는 아미노산 서열로 변경되었고, 이부분에 도입된 KpnI, SacI 제한효소를 이용함으로써 외래의 염기서열을 클로닝 하도록 하였다(PNAS 96:11241-11246). 이들에 의해서 만들어진 변종 형광 단백질은 37°C에서 형광을 거의 보이지 못하고 있었고, 28°C에서 형광을 보이는 특성을 보이고 있었다. 때문에 포유동물 세포주에서의 여러가지 세포내 활성을 측정하는 데에는 사용할 수 없다는 단점을 보이고 있었다. 같은 그룹에 따르면 이 캄가루(Camgaroo)를 돌연변이를 유발시켜 얻은 69번 아미노산인 글루타민이 메치오닌으로 변한 Q69M돌연변이는 37°C에서 형광을 보이고 있는 것으로 보고되었다 (JBC, 276:29188~29194).

<7> 본 발명자 등이 동일한 유전자를 제조하여 포유동물세포에 도입한 후 공초점 현미경으로 상을 잡아 본 결과 그 형광 강도가 매우 미약하여서 단백질의 결합 부위를 삽입하여 그 결합성의 변화를 보고자하는 연구나, 단백질 분해 효소에 대한 절단 부위를 삽입하는 등의 활용, 그리고 세포내의 칼슘 농도 측정 등이 거의 불가능함을 알 수 있었다. 따라서 외래 유전자의 삽입을 통한 연구가 현실적으로 가능하려면 삽입형광단백질의 형광 강도가 현저히 증가된 변종을 선별하고 이에 관한 연구가 선행되어야 했다.

<8> 본 발명은 이에 관한 것으로서 기존의 변종 단백질에서 제외되었던 145번 아미노산인 티로신을 도입하고 pcDNA3 운반체에 효율적으로 클로닝할 수 있도록 두 개의 제한효소 인자 부위(BamHI, 및 NheI)를 도입하고 동시에 적절한 펩타이드 연결 부위를 도입할 수 있도록 프라이머를 디자인 하였고, 이를 사용하여 돌연변이를 많이 유발할 수 있도록 하는 피씨알 클로닝을 수행함으로써 빛이 강하게 유지되는 변종 형광 단백질을 개발하고자 하였다.

<9> 이 방법으로 선별된 변종 형광 단백질은 145번 아미노산 부위에 YGGSGAS라는 아미노산 서열을 갖는 특징이 있다. 이러한 특징을 갖는 변종 형광 단백질을 와이시트린(Y-Citrine)이라 명명하였다. 이 부위는 기존의 변종 형광 단백질의 펩타이드 연결 부위와 비교하여 전기적성질을 거의 띠지 않고, 연결부위로서 작용할 수 있도록 고안되었고, 염기서열 상에서 유전자 운반체에는 존재하지 않는 제한 효소 인자 부위를 가지게 됨으로써 사용하는 유전자 운반체에서의 클로닝작업을 일회로 마칠 수 있는 특성을 가지게 된다.

<10> 또한 이 과정에서 새로운 돌연변이가 유발된 변종을 선별하였는데 이 변종단백질은 와이시트린이 가지고 있는 돌연변이 외에 192번 아미노산이 프롤린에서 라이신(P192L)으로 변이 된것을 확인하였고 이를 페리도트(Peridot)이라 명명하였다. 이는 와이시트린과 더불어 또 다른 삽입형 형광 단백질로서의 활용을 가능하게 해주는 것이었다.

<11> 본 발명에서 보여주고 있는 이 두종의 형광 단백질은 기존의 변종 형광 단백질에 비해 공초점 현미경에서 약 20배의 형광 강도를 보이고 있는 것으로 측정되었고, 이는 세포 수준의 약효평가에 사용할 수 있는 새로운 리포터의 출현을 의미하는 것이라 할 수 있다

이렇게 새로이 만들어진 리포터 단백질을 이용하여 그 삽입부위에 단백질 분해 효소의 절단 부위, 단백질 결합부위등을 삽입하고 그 산물의 형광을 분석함으로써 세포내에서 벌어지는 다양한 생명현상을 분석할 수 있는 길을 열어 놓은 것이라 할 수 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<12> 본 발명에서 개발하고자 한 것은 형광의 강도가 증강된 삽입형 황색 편이 녹색 형광 단백질(inserted YFP)의 개발이었다. 이를 위해서는 새로운 높은 형광 강도를 보이는 돌연변이의 선별, 웹타이드 연결부위의 엔지니어링, 간편한 클로닝을 위한 제한효소 인지부위의 도입등이 필요하였다.

【발명의 구성 및 작용】

<13> 본 발명은 간편한 클로닝을 위해 제한 효소 인지 서열(BamHI, 및 NheI)를 도입하였다. 이는 현재 사용하고 있는 포유동물 세포용 유전자 운반체인 pcDNA3에는 존재하지 않는 제한 효소 인지부위이다. 이 제한 효소 인지 부위를 포함하는 YGGSGAS의 웹타이드 연결부위를 삽입하였다. 이 웹타이드 연결부위는 기존의 GGTGEL에 비해 전기적 성질을 최소화 하였고 이로 인한 구조적 변화를 줄이고자 하였다.

<14> 또한 이 변이와 PCR 과정을 통해 도입된 새로운 돌연변이에 의해 강한 형광을 보이는 변종 형광 단백질을 포유동물 세포주인 헬라(HeLa) 세포주에서 선별함으로써 발명을 완성할 수 있었다. 도1a에 나타낸 바와 같이 새로이 제조된 삽입형광단백질은 기존의 천 그룹의 삽입형광단백질인 시트린인스(Citrine-ins)에 비해 현저히 증강된 형광 강도

를 보임을 이미지를 통해 알 수 있었고, 도1b에 나타낸 바와 같이 이를 공초점 현미경 하에서 정량한 결과 20배 정도의 형광 강도를 보이는 것을 알 수 있었다.

<15> 이를 선별된 변종 형광 단백질 와이시트린과 페리도트의 삽입부위에 사람의 C형 간염 바이러스의 단백질 분해효소(protease)인 NS3 단백질에 의한 절단 부위의 하나인 5AB 연결부위의 염기서열을 삽입하였을 때에도 그 형광을 유지하였고 이를 통해 세포수준에서의 C형 간염 바이러스의 단백질 분해효소의 활성을 평가할 수 있는 방법의 개발 등을 가능하게 하였다.

【발명의 효과】

<16> 본 발명은 포유동물 세포내에서(37°C) 기존의 동종 단백질에 비해 그 형광강도가 20배에 달하는 삽입형광단백질을 개발함으로써 다양한 단백질 부위의 삽입을 통한 연구를 현실화 할 수 있었다는 것과 포유동물 세포형 유전자 운반체에서의 클로닝이 한 단계로 간편해 졌다는 것을 특징으로 한다.

<17> 제조된 변종 형광단백질의 삽입부위에 C형 간염바이러스의 NS3 단백질 분해효소(protease)의 절단부위인 5AB를 삽입하였을 때에도 그 형광을 유지한다는 데에서 5AB삽입형광단백질(Y-Citrine-5AB 및 Peridot-5AB)를 기질로 이용하는 C형간염 바이러스 단백질 분해효소 활성 분석 시스템(HCV protease assay system)의 개발이 가능해졌음을 알 수 있다.

20020012409

출력 일자: 2003/3/14

THIS PAGE BLANK (USPTO)

【특허청구범위】**【청구항 1】**

Y145YGGSGAS의 돌연변이를 포함하고 있는 형광 단백질

【청구항 2】

청구항 1에서의 형광 단백질을 코딩하고 있는 유전자 염기서열

【청구항 3】

청구항 1에서 BamHI, NheI의 제한효소 인지부위를 갖는 염기서열

【청구항 4】

P192L의 돌연변이를 포함하고 있는 형광단백질

【청구항 5】

청구항 4를 코딩하고 있는 유전자 염기서열

【청구항 6】

청구항 1 또는 청구항 4에 있어서 삽입부위에 단백질 또는 단백질 결합 부위가 삽입된 형광단백질

【청구항 7】

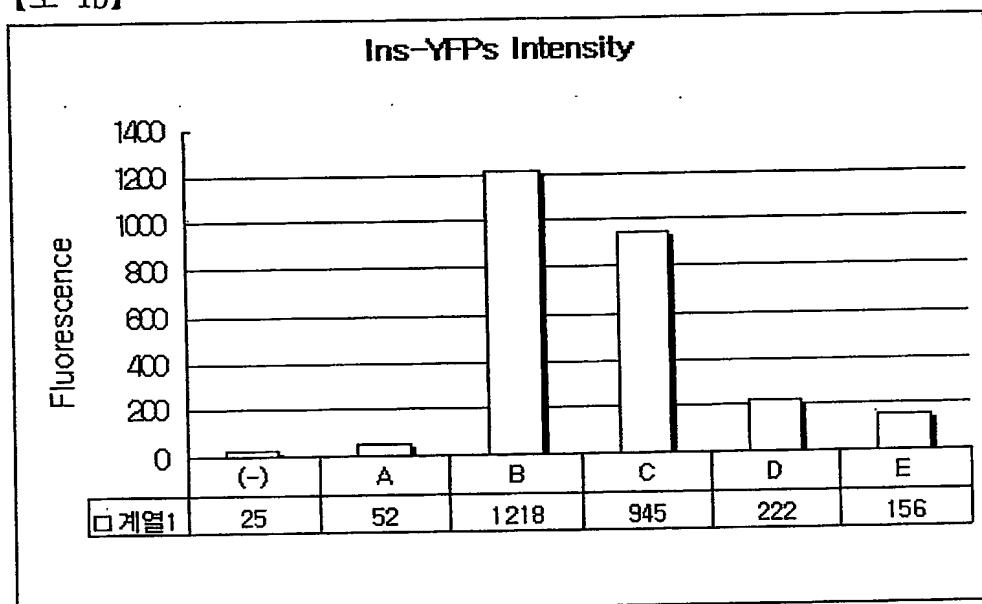
청구항 6에 있어서 사람의 C형 간염 바이러스의 NS3 단백질 분해효소 (HCV NS3)의 절단 부위를 삽입하여 단백질 분해 효소의 기질로 사용하는 방법

【도면】

【도 1a】



【도 1b】



【서열목록】

<110> NEUROGENEX Co.Ltd. <120> Enhanced inserted YFP <160> 4 <170>
 Kopatent In 1.71 <210> 1 <211> 738 <212> DNA <213> Aequorea victoria
 <220> <221> CDS <222> (1)..(735) <223> y-citrine DNA sequence <400> 1

atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg 48 Met Val
 Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu 1 5
 10 15 gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtc
 tcc ggc 96 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30 gag ggc gag ggc gat gcc acc tac
 ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc 144 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys
 Leu Thr Leu Lys Phe Ile 35 40 45
 tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg act acc 192 Cys Thr
 Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr 50
 55 60 ttc ggc tac ggc ctg atg tgc ttc gcc cgc tac
 ccc gac cac atg aag 240 Phe Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp
 His Met Lys 65 70 75 80 cag
 cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag 288 Gln His Asp
 Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu 85
 90 95 cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc
 gcc gag 336 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110 gtg aag ttc gag ggc gac acc
 ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc 384 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val
 Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly 115 120 125
 atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac 432 Ile Asp
 Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr 130

135	140	aac tac ggt gga tcc ggt gct agc aac agc		
cac aac gtc tat atc atg	480	Asn Tyr Gly Gly Ser Gly Ala Ser Asn Ser His Asn		
Val Tyr Ile Met	145	150	155	160
gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac				528 Ala Asp
Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His				165
170	175	aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac		
cag cag aac	576	Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln		
Asn	180	185	190	acc ccc atc
ggc gac ggc ccc gtg ctg ccc gac aac cac tac ctg			624	Thr Pro Ile Gly Asp
Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu			195	200
205	agc tac cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac			
672 Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His				210
215	220	atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc		
ggg atc act ctc ggc atg	720	Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile		
Thr Leu Gly Met	225	230	235	240
gac gag ctg tac aag		taa		738 Asp Glu
Leu Tyr Lys				245
<210> 2 <211> 245 <212> PRT <213> Aequorea victoria <400> 2 Met Val Ser Lys				
Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu	1		5	
10	15	Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser		
Gly	20	25	30	Glu Gly Glu Gly Asp Ala

Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile 35 40
 45 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr 50
 55 60 Phe Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met
 Lys 65 70 75 80 Gln His Asp Phe
 Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu 85
 90 95 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala
 Glu 100 105 110 Val Lys Phe Glu Gly Asp
 Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly 115 120
 125 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr 130
 135 140 Asn Tyr Gly Gly Ser Gly Ala Ser Asn Ser His Asn Val Tyr Ile
 Met 145 150 155 160 Ala Asp Lys Gln
 Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His 165
 170 175 Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln
 Asn 180 185 190 Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu 195 200
 205 Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His 210
 215 220 Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly
 Met 225 230 235 240 Asp Glu Leu Tyr
 Lys 245 <210> 3 <211> 738 <212> DNA <213> Aequorea
 victoria <220> <221> CDS <222> (1)..(735) <223> Peridot DNA sequence <400>
 3 atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg 48

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu 1
 5 10 15 gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc
 cac aag ttc agc gtg tcc ggc 96 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys
 Phe Ser Val Ser Gly 20 25
 gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc 144 Glu Gly
 Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile 35
 40 45 tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc
 ctc gtg act acc 192 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val
 Thr Thr 50 55 60 ttc ggc
 tac ggc ctg atg tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg aag 240 Phe Gly Tyr Gly
 Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys 65 70
 75 80 cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag
 gag 288 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95 cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc
 aac tac aag acc cgc gcc gag 336 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr
 Lys Thr Arg Ala Glu 100 105 110
 gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc 384 Val Lys
 Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly 115
 120 125 atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg
 cac aag ctg gag tac 432 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys
 Leu Glu Tyr 130 135 140 aac

tac ggt gga tcc ggt gct agc aac agc cac aac gtc tat atc atg 480 Asn Tyr Gly
 Gly Ser Gly Ala Ser Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met 145 150
 155 160 gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg aac ttc aag atc
 cgc cac 528 Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His
 165 170 175 aac atc gag gac ggc agc gtg cag
 ctc gcc gac cac tac cag cag aac 576 Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala
 Asp His Tyr Gln Gln Asn 180 185 190
 acc ccc atc ggc gac ggc ctc gtg ctg ccc gac aac cac tac ctg 624 Thr Pro
 Ile Gly Asp Gly Leu Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu 195
 200 205 agc tac cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac
 gag aag cgc gat cac 672 Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys
 Arg Asp His 210 215 220 atg
 gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc ggg atc act atc ggc atg 720 Met Val Leu
 Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Ile Gly Met 225 230
 235 240 gac gag ctg tac aag taa
 738 Asp Glu Leu Tyr Lys
 245 <210> 4 <211> 245 <212> PRT <
 213> Aequorea victoria <400> 4 Met Val Ser Lys Gly Glu Leu Phe Thr Gly Val Val
 Pro Ile Leu 1 5 10 15 Val Glu Leu
 Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly 20
 25 30 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe

Ile	35	40	45	Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro
Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr		50	55	60
Phe Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys		65		
70	75	80	Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro	
Glu Gly Tyr Val Gln Glu		85	90	95
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu				100
105	110	Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys		
Gly	115	120	125	Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly
Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr		130	135	140
Asn Tyr Gly Gly Ser Gly Ala Ser Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met		145		
150	155	160	Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val	
Asn Phe Lys Ile Arg His		165	170	175
Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn				180
185	190	Thr Pro Ile Gly Asp Gly Leu Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr		
Leu	195	200	205	Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His		210	215	220
Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Ile Gly Met		225		
230	235	240	Asp Glu Leu Tyr Lys	245

【서지사항】

【서류명】 서지사항 보정서
 【수신처】 특허청장
 【제출일자】 2002.03.09
 【제출인】
 【명칭】 (주)뉴로제넥스
 【출원인코드】 1-2001-043953-3
 【사건과의 관계】 출원인
 【사건의 표시】
 【출원번호】 10-2002-0012409
 【출원일자】 2002.03.08
 【심사청구일자】 2002.03.08
 【발명의 명칭】 형광강도가 증강된 삽입형 녹색 형광단백질 및 그 유전자
 【제출원인】
 【접수번호】 1-1-02-0068203-05
 【접수일자】 2002.03.08
 【보정할 서류】 특허출원서
 【보정할 사항】
 【보정대상항목】 발명자
 【보정방법】 정정
 【보정내용】
 【발명자】
 【성명의 국문표기】 신동승
 【성명의 영문표기】 SEEN, Dongseung
 【주민등록번호】 680930-1168211
 【우편번호】 151-782
 【주소】 서울특별시 관악구 봉천본동 두산아파트 108-2104
 【국적】 KR
 【발명자】
 【성명의 국문표기】 박재용
 【성명의 영문표기】 PARK, Jae Yong
 【주민등록번호】 680415-1056218

【우편번호】	150-043
【주소】	서울특별시 영등포구 당산동3가 평화아파트 C-201
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	손호선
【성명의 영문표기】	SON, Hosun
【주민등록번호】	700509-1775012
【우편번호】	151-782
【주소】	서울특별시 관악구 봉천본동 두산아파트 107-1205
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	강 안토니
【성명의 영문표기】	KANG, Anthony D.
【주소】	서울 관악구 봉천5동 관악드림타운 110-1602
【국적】	US
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정연철
【성명의 영문표기】	JUNG, Neon C.
【주민등록번호】	701225-1674616
【우편번호】	151-774
【주소】	서울특별시 관악구 봉천5동 삼성아파트 133-1801
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김경진
【성명의 영문표기】	KIM, Kyungjin
【주민등록번호】	520101-1024511
【우편번호】	120-757
【주소】	서울특별시 서대문구 대현동 럭키아파트 104-1102
【국적】	KR
【취지】	특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정 에의하여 위와 같 이 제출합니다. 제출인 (주)뉴로제넥스 (인)

20020012409

출력 일자: 2003/3/14

【수수료】

【보정료】 0 원

【기타 수수료】 원

【합계】 0 원

【서지사항】

【서류명】 서지사항 보정서

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2002.03.29

【제출인】

【명칭】 (주)뉴로제넥스

【출원인코드】 1-2001-043953-3

【사건과의 관계】 출원인

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2002-0012409

【출원일자】 2002.03.08

【심사청구일자】 2002.03.08

【발명의 명칭】 형광강도가 증강된 삽입형 녹색 형광 단백질 및 그 유전자

【제출원인】

【접수번호】 1-1-02-0068203-05

【접수일자】 2002.03.08

【보정할 서류】 특허출원서

【보정할 사항】

【보정대상항목】 첨부서류

【보정방법】 제출

【보정내용】

【첨부서류】 1. 중소기업기본법시행령 제2조에의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류_1통

【취지】 특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 제출인
(주)뉴로제넥스 (인)

【수수료】

【보정료】 0 원

【기타 수수료】 원

【합계】 0 원

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.